

Zastosowanie metody odciętych liści do oceny patogeniczności izolatów grzybów *Ascochyta fabae* i *Botrytis fabae* wobec bobiku

Application of the detached-leaf technique to evaluate the pathogenicity of isolates of fungi *Ascochyta fabae* and *Botrytis fabae* to faba bean

Tomasz Góral 

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biologii Stosowanej
Radzików, 05-870 Błonie

✉ t.goral@ihar.edu.pl

Do najważniejszych chorób bobiku należą askochytoza powodowana przez grzyb *Ascochyta fabae* oraz czekoladowa plamistość powodowana przez grzyb *Botrytis fabae*. Przebadano patogeniczność izolatów *A. fabae* i *B. fabae* wobec sześciu odmian bobiku. Zastosowano technikę odciętych liści. Liście inokulowano zarodnikami picydialnymi i konidialnymi badanych patogenów. Po inkubacji określano rozmiary plam nekrotycznych wytwarzanych przez patogeny. Stwierdzono istotne zróżnicowanie patogeniczności izolatów obu grzybów. Odmiany wykazały zróżnicowaną odporność na askochytozę i czekoladową plamistość. Zróżnicowanie odporności odmian na czekoladową plamistość było mniejsze niż odporności na askochytozę. Opisano możliwość wykorzystania programu do analizy obrazu ImageJ do pomiaru powierzchni plam nekrotycznych.

Słowa kluczowe: analiza obrazu, askochytoza, czekoladowa plamistość, odporność, *Vicia faba*

The most important diseases of the faba bean include *Ascochyta* blight caused by the fungus *Ascochyta fabae* and chocolate spot caused by the fungus *Botrytis fabae*. The pathogenicity of isolates of *A. fabae* and *B. fabae* was investigated against six cultivars of faba bean. The technique of detached leaves was used. The leaves were inoculated with pycnidial and conidial spores of the pathogens tested. After incubation, the sizes of the necrotic spots produced by the pathogens were determined. Significant variation in the pathogenicity of isolates of both fungi was found. The varieties showed differential resistance to *Ascochyta* blight and chocolate spot. The variation in resistance of cultivars to chocolate spot was lower than resistance to *Ascochyta* blight. The possibility of using the ImageJ image analysis software to measure the surface of necrotic lesions was described.

Keywords: *Ascochyta* blight, chocolate spot, image analysis, resistance, *Vicia faba*

Wstęp

Bobik (*Vicia faba* L. ssp. *minor*) należy do bobowatych grubonasiennych (Fouad i in., 2013). Uprawiany jest na nasiona, które mają wysoką zawartość białka (25-30%) i mogą stanowić surowiec do produkcji białkowych pasz dla zwierząt (Grela i Czech, 2019). Dodatkową zaletą uprawy bobiku jest poprawa struktury gleby poprzez jej rozluźnianie oraz wzbogacanie w substancję organiczną. Dzięki uprawie bobiku gleba wzbogacana jest w azot asymilowany przez bakterie brodawkowate. Ma to szczególne znaczenie w uprawie ekologicznej, w której nie stosuje się sztucznych nawozów azotowych.

Powierzchnia uprawy bobiku w Polsce wynosiła ok. 35 tys. hektarów w roku 2022 (Panek 2022). W ostatnich 10 latach wzrosła prawie 4-krotnie. Powierzchnia ta jest niższa niż powierzchnia uprawy łubinów, grochu siewnego i soi. Wynika to przede wszystkim z wysokich wymagań bobiku co do warunków glebowych oraz dużych potrzeb wodnych w okresie od two-

żenia pąków do wykształcania strąków. Bobik jest również silnie porażony przez szkodniki (mszyce, oprzędziki, strąkowiec bobowy) i patogeny wywołujące choroby grzybowe. Największe znaczenie w uprawach bobiku mają askochytoza powodowana przez grzyb *Ascochyta fabae* Speg. (teleomorfa *Didymella fabae* Jellis & Punith) oraz czekoladowa plamistość powodowana przez grzyb *Botrytis fabae* Sard. (Díaz-Ruiz i in., 2009; Kaur i in., 2014; Zakrzewska, 2004, 1988). Askochytoza jest powszechną chorobą w uprawach bobiku powodując straty plonu do 90% u wrażliwych odmian, gdy warunki środowiskowe sprzyjają rozwojowi choroby (Hanounik i Robertson, 1989). Grzyb infekuje wszystkie nadziemne części roślin, w tym nasiona (Sillero i in., 2010).

Odporność bobiku na askochytozę (*A. fabae*) jest cechą złożoną. Jest on kontrolowana zarówno przez pojedyncze geny główne, jak i poligenicznie (Avila i in., 2004; Kohpina i in., 2000a; Ondřej i Huňady, 2007; Román i in., 2003; Sillero i in., 2010). Zidentyfikowano również geny związane z odpornością zarówno liści, jaki i łodyg, a także

grupy genów determinujące odporność jedynie liści lub łodyg (Kharrat i in., 2006). Dodatkowo stwierdzono obecność QTL odporności efektywnych przeciwko różnym izolatom *A. fabae*, ale także QTL efektywne tylko wobec pojedynczych izolatów (Avila i in., 2004). Wskazuje to na potrzebę stosowania szerokiego spektrum izolatów *A. fabae* do testowania odporności bobiku. W związku z powyższym niektórzy badacze sugerują istnienie ras patogenu, jednakże nie jest to w pełni udokumentowane (Díaz-Ruiz i in., 2009; Tivoli i in., 2006). W populacji *A. fabae* identyfikuje się raczej grupy patogeniczności w zależności od nasilenia objawów choroby powodowanej przez izolaty na zestawie odmian o zróżnicowanej odporności (Blake i in., 2022). Rozmnażanie płciowe pozwala na powstanie nowych kombinacji wirulencji, co wiąże się z możliwością reakcji patogenu na selekcję wywieraną przez wprowadzenie genów oporności gospodarza (Ozkilinc i in., 2015; Rubiales i Trapero-Casas, 2002).

W przypadku *B. fabae* wywołującego czekoladową plamistość nie obserwuje się tego poziomu specjalizacji. Stopień odporności bobiku na tę chorobę jest niski i zidentyfikowano jedynie nieznaczne źródła odporności (Gela i in., 2022; Sillero i in., 2010).

Badanie odporności bobiku na askochytozę i czekoladową plamistość jest pracochłonne i wymaga stworzenia odpowiednich warunków prowokacyjnych dla rozwoju tych chorób (Zakrzewska, 2004, 1988). Przyspieszenie procesu selekcji genotypów odpornych można uzyskać wykorzystując technikę odciętych liści (Herath i in., 2001; Kohpina i in., 2000b; Tivoli i in., 2006). W przypadku askochytozy bobiku należy brać pod uwagę, że reakcja liści i łodyg na infekcję grzybem *A. fabae* może być różna (Avila i in., 2004). W związku z tym Kohpina i in., (2000b) proponują używanie również fragmentów łodyg w celu uzyskania bardziej wiarygodnych wyników pokazujących odporność genotypów bobiku na askochytozę. Ze złożoności reakcji bobiku na askochytozę wynika, że korelacja wyników uzyskanych w warunkach laboratoryjnych i polowych nie zawsze jest wysoka. Wpływa na to wspomniana powyżej różna odporność liści oraz łodyg na infekcję *A. fabae*, ale także fakt, że grzyb poraża również strąki (Zakrzewska, 2004). Na rozwój choroby w warunkach polowych wpływ ma również długość łodygi oraz typ kwiatostanu (Jellis i in., 1985; Pritchard i in., 1989; Zakrzewska, 2004). W przypadku czekoladowej plamistości uzyskiwano zadowalającą zgodność wyników testów na odciętych liściach i testów w warunkach polowych (Zaki, 2010). Zgodność ta była najmniejsza dla genotypów o średniej odporności na tę chorobę (Bouhassan i in., 2004; Tivoli i in., 2006; Villegas-Fernández i in., 2011).

Celem pracy było przebadanie patogeniczności izolatów *A. fabae* i *B. fabae* oraz odporności odmian bobiku na choroby powodowane przez te patogeny z wykorzystaniem techniki odciętych liści. Testowano również możliwość wykorzystania oprogramowania do analizy obrazu do precyzyjnej i zautomatyzowanej oceny nasilenia powyższych chorób na odciętych liściach bobiku.

Material i metody

Przeprowadzono ocenę patogeniczności izolatów grzybów *Ascochyta fabae* i *Botrytis fabae* wobec odmian bobiku. Do badań zastosowano sześć odmian bobiku: Bobas – odmiana tradycyjna, wysokotaninowa; Albus, Amulet, Kasztelan – odmiany tradycyjne, niskotaninowe; Granit, Optimal – odmiany samokończące, wysokotaninowe. Nasiona bobiku uzyskano z firm hodowlanych (Albus, Amulet, Granit, Kasztelan – Hodowla Roślin Strzelce; Bobas, Optimal – DANKO Hodowla Roślin).

Izolaty *A. fabae* i *B. fabae* zostały uzyskane z liści wykazujących objawy askochytozy i czekoladowej plamistości oraz z nasion z objawami porażenia (Tabela 1). Izolaty przechowywane są w kolekcji Zakładu Biologii Stosowanej IHAR-PIB.

W celu uzyskania zarodników grzyby *A. fabae* i *B. fabae* hodowane były na pożywce z PDA (agar glukozowo-ziemniaczany) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Niemcy) z dodatkiem mączki z nasion bobiku (Zakrzewska, 2004). Szalki nasświetlane były światłem UV (black light, 360 nm) w cyklu 12/12h w celu stymulacji zarodnikowania (Rys. 1). Powierzchnię szalek, na których obserwowano zarodnikowanie grzybów, zmywano wodą destylowaną. Powstałą zawiesinę filtrowano przez gazę w celu usunięcia fragmentów grzybni. Stężenie zawiesiny ploidiospor *A. fabae* ustalono na 100 000 zarodników w 1 mililitrze, natomiast konidiospor *B. fabae* na 500 000 zarodników w 1 mililitrze. Pomiar stężenia zarodników wykonano za pomocą komory hematologicznej Thoma (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Niemcy). Dla wszystkich badanych izolatów obu gatunków ustalono takie same stężenia zarodników.

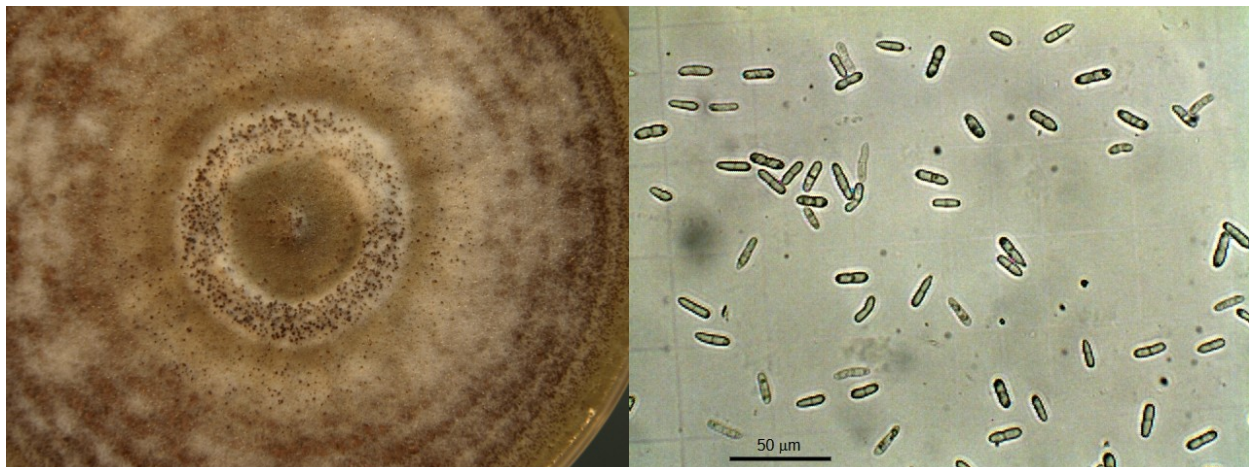
Do oceny patogeniczności izolatów i odporności odmian zastosowano metodę odciętych liści (Walentyn-Góral i Góral, 2011; Góral i Walentyn-Góral, 2012). Wysterylizowane liście bobiku umieszczano na kwadratowych szalkach Petriego o wymiarze 12,5 × 12,5 cm (Bionovo, Legnica, Polska). Pożywkę stanowił agar wodny (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Niemcy) z dodatkiem 100 mg benzimidazolu (Merck Life Science Sp. z o.o., Poznań, Polska) na litr. Każdy z listków inokulowano kroplą (50 ml) zawiesiny zarodników *A. fabae* lub *B. fabae*. Kroplę umieszczano na środku listka w miejscu nakłutym igłą. Na każdym

Tabela 1
Table 1Lista izolatów *Ascochyta fabae* i *Botrytis fabae*
List of isolates of *Ascochyta fabae* and *Botrytis fabae*

Gatunek Species	Izolat Isolate	Źródło Source	Odmiana Cultivar	Rok izolacji Isolation year
<i>A. fabae</i>	AF 5-1	nasiona / seeds	Titus	*
<i>A. fabae</i>	AF 5-2	nasiona / seeds	Titus	*
<i>A. fabae</i>	AF 6-1	nasiona / seeds	Amulet	2009
<i>A. fabae</i>	AF 6-2	nasiona / seeds	Amulet	2009
<i>A. fabae</i>	AF 7-1	liście / leaves	Kasztelan	2012
<i>A. fabae</i>	AF 7-3	liście / leaves	Granit	2012
<i>A. fabae</i>	AF 8-1	liście / leaves	Bobas	2013
<i>A. fabae</i>	AF 8-2	liście / leaves	Amulet	2013
<i>A. fabae</i>	AF 15-1	nasiona / seeds	Albus	2017
<i>A. fabae</i>	AF 15-4	nasiona / seeds	Granit	2017
<i>B. fabae</i>	BF 1	liście / leaves	Optimal	2017
<i>B. fabae</i>	BF 2	liście / leaves	Optimal	2017
<i>B. fabae</i>	BF 3	liście / leaves	Granit	2017
<i>B. fabae</i>	BF 4	liście / leaves	Granit	2017

* – nasiona przechowywane w zamrażarce, zebrane w roku 2004

* – seed stored in refrigerator, collected in 2004

Rys. 1. Izolat *Ascochyta fabae* rosnący na pożywce PDA z mączką z nasion bobiku (z lewej); pycnidiospory *A. fabae* (z prawej)Fig. 1. Isolate of *Ascochyta fabae* growing on a PDA medium with faba bean seed meal (left); pycnidiospores of *A. fabae* (right)

liściu inokulowano 4-5 listków. Szalki z liśćmi inkubowane były w komorze hodowlanej (Sanyo Electric, Moriguchi, Japonia) w temperaturze 20°C. Długość dnia wynosiła 12h. Po pojawieniu się objawów wykonano pomiary wielkości plam nekrotycznych w 5 terminach (7, 10, 14, 16, 21 dni po inokulacji). Wyliczono średnią powierzchnię plamy dla każdego liścia. W terminie 21 dpi wykonano zdjęcia porażonych liści. Dla każdego z patogenów przeprowadzono dwa doświadczenia infekcyjne w dwóch powtórzeniach.

Analiza statystyczna została wykonana za pomocą pakietu XLSTAT Life Science (Version 2021.3.1.1177, Lumivero, Denver, CO, USA).

Przeprowadzono analizę wariancji dla średniej powierzchni plam nekrotycznych powodowanych przez *A. fabae* i *B. fabae* (procedura XLSTAT: ANOVA). Czynniki stanowiły: izolat, odmiana oraz termin pomiaru. Średnie dla odmian i izolatów porównywano testem wielokrotnych porównań NIR Fishera.

Na wybranych zdjęciach dokonano pomiaru powierzchni plam za pomocą programu do analizy obrazu ImageJ (<https://imagej.net>) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, Stany Zjednoczone. oraz the Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, University of Wisconsin, Madison, WI, Stany Zjednoczone) (Scheider i in.,

2012). Celem tych pracy było sprawdzenie możliwości wykorzystania analizy obrazu do oceny wielkości plam nekrotycznych na liściach bobiku.

Po otwarciu obrazu liścia (format TIFF, GIF, JPEG, BMP i inne) przeprowadzono wstępne korekty obrazu (np. *Image > Adjust > Brightness/Contrast*, *Image > Adjust > Color Balance*). Następnie określono skalę pomiarową obrazu w celu uzyskania rzeczywistej powierzchni mierzonej plamy nekrotycznej (*Analyze > Set Scale*). Zaznaczono plamę nekrotyczną, której powierzchnię mierzono za pomocą polecenia *Image > Adjust > Color Threshold*. Wyróżniony obszar obrysowano używając polecenia *Wand Tool* (ikona na pasku ikon programu ImageJ). Opcje *Wand Tool* można modyfikować poleceniem *Edit > Options > Wand Tool*. Powierzchnię zaznaczonego obszaru obliczono używając polecenia *Analyze > Analyze Particles*. Cały proces można zautomatyzować nagrywając makro obejmujące powyższe polecenia (*Plugins > Macros > Record*).

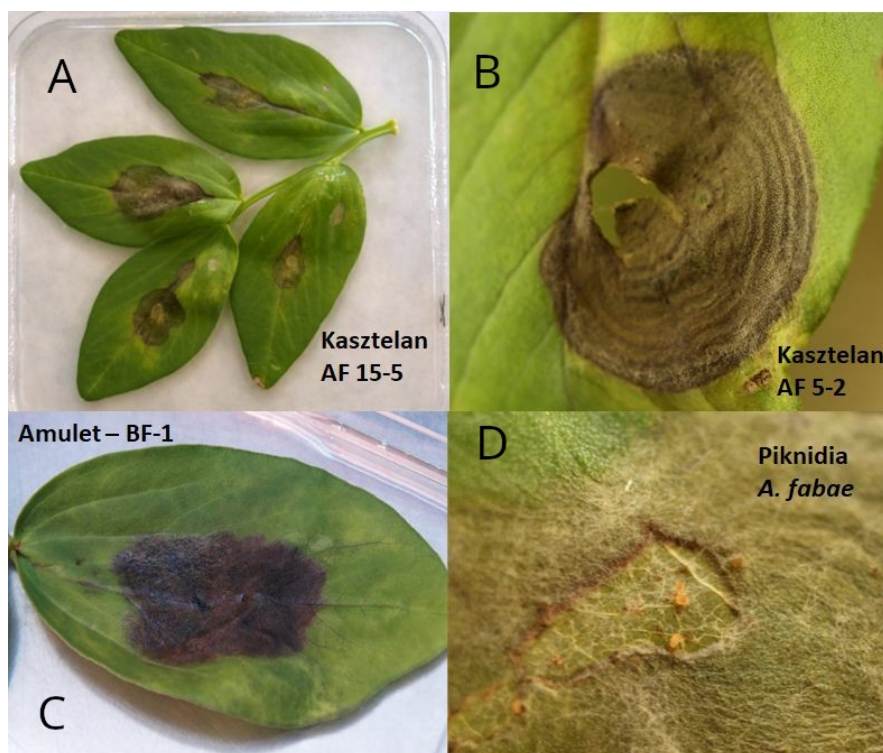
Wyniki i Dyskusja

Wszystkie badane izolaty *A. fabae*, *B. fabae* wykazały patogenność wobec badanych odmian bobiku. Objawy w postaci nekroz pojawiały się około 7 dni po inokulacji. Następnie nekrozy powiększały się, w niektórych przypadkach obejmując całą powierzchnię pojedynczego listka

(Rys. 2). Powierzchnia nekroz wywarzanych przez *B. fabae* była przeciętnie 3-krotnie większa niż powodowanych przez *A. fabae*. Na plamach nekrotycznych powstałych na liściach inokulowanych *A. fabae* tworzyły się piknidia, uwalniające zarodniki piknidialne (rys. 2D).

Patogeniczność izolatów *A. fabae* była zróżnicowana (Tab. 2, Rys. 3). Na podstawie wielkości plam nekrotycznych wyróżnione zostały dwie grupy izolatów. Pierwsza obejmowała 4 izolaty o wysokiej patogenności: 15-4, 15-1, 7-3, 8-2. Najwyższą patogenność wykazały izolaty 15-4 i 15-1 uzyskane w roku 2015 z porażonych nasion bobiku z doświadczenia polowego w Radzikowie. Izolaty 7-3 i 8-2 uzyskano z porażonych liści zebranych w latach 2012 i 2013. Druga grupa obejmowała 6 izolatów o istotnie niższej patogenności, Różnice między nimi nie były istotne statystycznie. Izolaty *A. fabae* cechują się dużym zróżnicowaniem agresywności wobec bobiku (Blake i in., 2022). Wiąże się to z faktem, że *A. fabae* jest gatunkiem heterotalicznym i do wytworzenia się pseudotecjów i zarodników workowych wymagana jest obecność dwóch typów kojarzeniowych MAT-1 i MAT-2 (Kaiser i in., 2007).

Odmiany bobiku wykorzystane do badań na odciętych liściach różniły się istotnie statystycznie



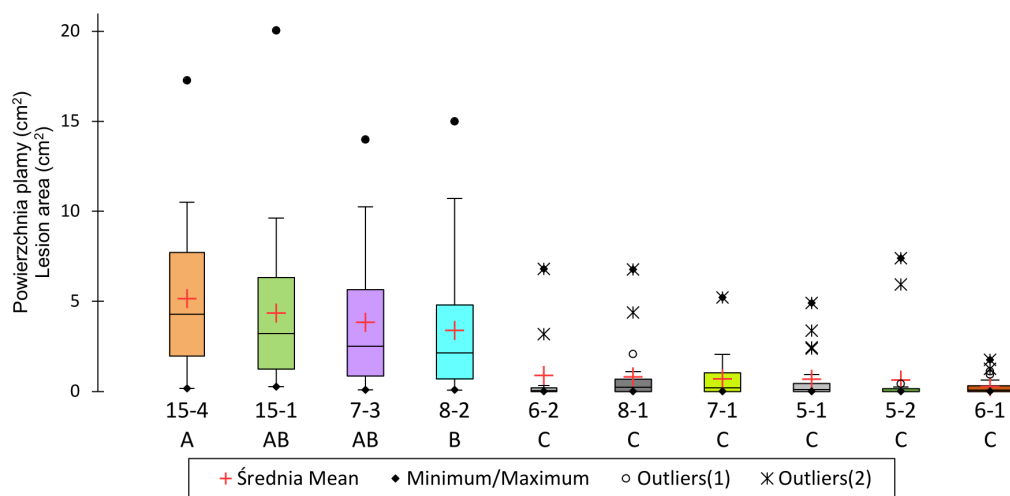
Rys. 2. A. Plamy nekrotyczne na liściu bobiku (odmiana Kasztelan) powstałe na skutek inokulacji punktowej zarodnikami grzyba *A. fabae*, izolat AF 15-5; B. Plama nekrotyczna na liściu bobiku odmiany Kasztelan z tworzącymi się piknidiami grzyba *A. fabae*, izolat AF 5-2; C. Plama nekrotyczna na liściu bobiku (odmiana Amulet) powstała na skutek inokulacji punktowej zarodnikami grzyba *B. fabae*, izolat BF-1; D. Piknidia grzyba *A. fabae* na liściu bobiku uwalniające piknidiospory.

Fig. 2. A. Necrotic lesions on faba bean leaves (cultivar Kasztelan) caused by *A. fabae* isolate AF15-5 after point inoculation with pycnidiospores; B. Necrotic lesion on faba bean cultivar Kasztelan with formatting pycnidia of *A. fabae*, isolate AF5-2; C. Necrotic lesion on faba bean leaves (cultivar Amulet) caused by *B. fabae* after point inoculation with conidiospores; D. Pycnidia of *A. fabae* on a faba bean leaves releasing pycnidiospores.

Tabela 2
Table 2

Analiza wariancji powierzchni plam nekrotycznych wytwarzanych przez izolaty *A. fabae* i *B. fabae* na sześciu odmianach bobiku
 Analysis of variance of area of necrotic lesions produced by *A. fabae* and *B. fabae* isolates on six cultivars of faba bean

Źródło zmienności Source of variation	<i>Ascochyta fabae</i> (10 izolatów / 10 isolates)		<i>Botrytis fabae</i> (4 izolaty / 4 isolates)	
	F	Pr > F	F	Pr > F
Odmiana / Cultivar	10,037	0,000	3,570	0,005
Izolat / Isolate	19,557	0,000	55,716	0,000
Termin / Date	62,114	0,000	153,423	0,000
Odmiana × Izolat Cultivar × isolate	1,971	0,001	3,723	0,000
Odmiana × date Cultivar × experiment	2,137	0,064	0,857	0,576
Izolat × date Isolate × experiment	6,801	0,000	10,649	0,000



Rys. 3. Zróżnicowanie agresywności izolatów *A. fabae* wobec sześciu odmian bobiku określone z wykorzystaniem techniki odciętych liści. Izolaty oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie dla $\alpha = 0,05$ (analiza wariancji, test NIR Fishera)

Fig. 3. Pathogenicity of isolates of *A. fabae* towards six faba bean cultivars evaluated using detached leaves technique. Isolates marked with the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$ (analysis of variance, Fisher's LSD test)

pod względem odporności na askochytozę powodowaną przez 4 izolaty o najwyższej patogeniczności (Tab. 3, Rys. 4). Najwyższą odporność wykazała odmiana Bobas. Z tym że nie różniła się ona istotnie od odmiany Optimal (SK).

Najbardziej podatna była odmiana Albus. Odmiany Kasztelan, Granit (SK) i Amulet były mniej podatne i nie różniły się istotnie. Odmiany samokończące bobiku Granit i Optimal wykazały średnią lub niską podatność na porażenie odciętych liści askochytozą. Tymczasem w warunkach naturalnej infekcji w polu były one najsilniej porażane askochytozą bobiku (Boros i in. 2014; T. Góral niepublikowane). Podobne wyniki uzyskała Zakrzewska (2004) porównując odporność form tradycyjnych i samokończących form bobiku po inokulacji *A. fabae* w kilkuletnich doświadczeniach polowych. Otrzymane wyniki mogą sugerować, że nie ma bezpośredniego wpływu genu determinującego kwiatostan szczytowy (*Vf_TFL1*) na odpor-

ność bobiku na askochytozę (Avila i in., 2007). Zwiększona podatność odmian samokończących na askochytozę w warunkach polowych wynika raczej ze znacznie mniejszej długości łodygi tych odmian (około 30-40 cm wg danych COBORU) (Jellis i in., 1985; Pritchard i in., 1989; Zakrzewska, 2004).

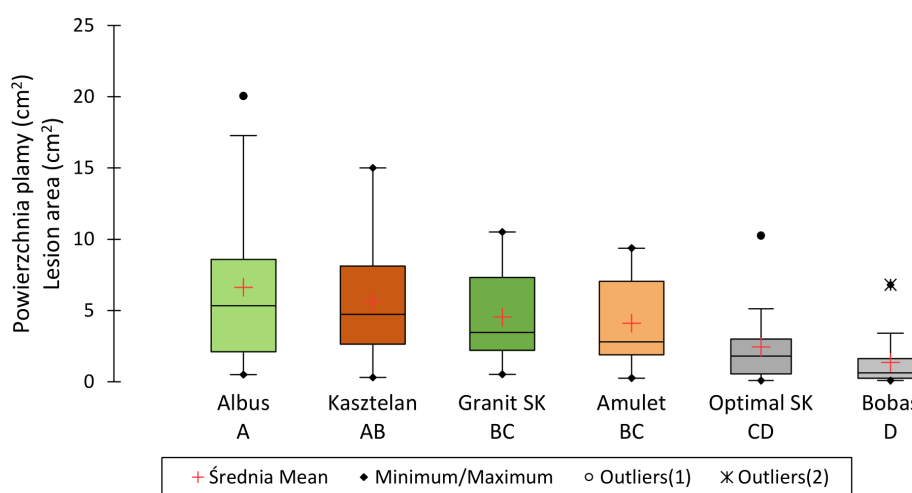
Patogeniczność izolatów *B. fabae* była również zróżnicowana (Tab. 1, Rys. 5). Na podstawie wielkości plam nekrotycznych wyróżnione zostały dwie grupy izolatów. Pierwsza obejmowała 2 izolaty o wysokiej patogeniczności: BF 3, BF 1. Druga grupa obejmowała 2 izolaty o istotnie niższej patogeniczności: BF 2 i BF 4. Różnice między izolatami w obu grupach nie były istotne statystycznie.

Odmiany bobiku różniły się istotnie statystycznie pod względem odporności na czekoladową plamistość powodowaną przez dwa izolaty o najwyższej patogeniczności (Tab. 2, Rys. 6).

Tabela 3
Table 3

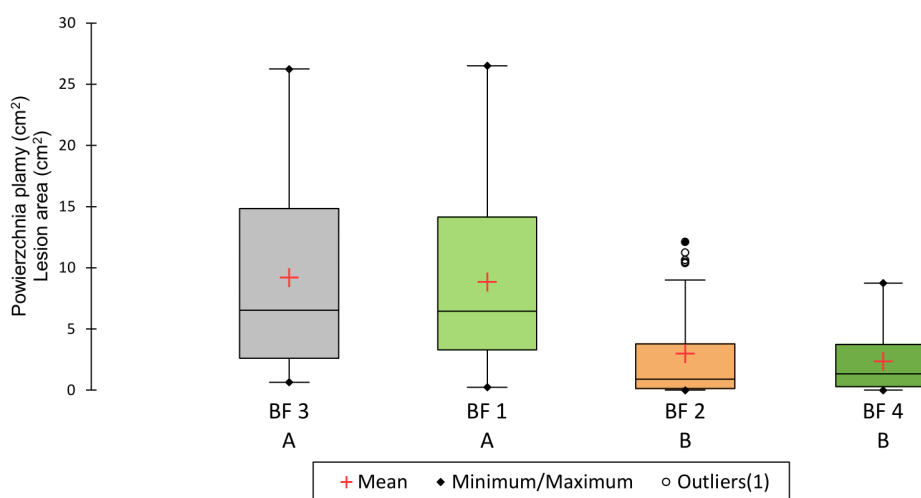
Analiza wariancji powierzchni plam nekrotycznych wytwarzanych przez izolaty *A. fabae* i *B. fabae* na sześciu odmianach bobiku
Analysis of variance of area of necrotic lesions produced by *A. fabae* and *B. fabae* isolates on six cultivars of faba bean

Źródło zmienności Source of variation	<i>Ascochyta fabae</i> (4 izolatów / 4 isolates)		<i>Botrytis fabae</i> (2 izolaty / 2 isolates)	
	F	Pr > F	F	Pr > F
Odmiana / Cultivar	6,963	0,000	2,634	0,036
Izolat / Isolate	1,223	0,309	0,183	0,670
Termin / Date	58,043	0,000	110,024	0,000
Odmiana × Izolat Cultivar × Isolate	1,177	0,314	6,116	0,000
Odmiana × Termin Cultivar × Date	1,817	0,123	0,711	0,710
Izolat × Termin Isolate × Date	0,089	0,966	0,492	0,615



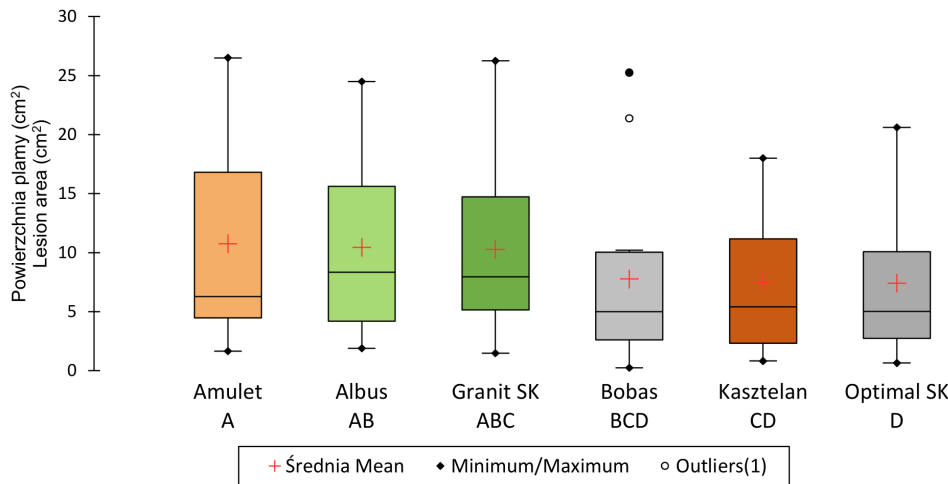
Rys. 4. Odporność odmian bobiku na porażenie 4 izolatami *A. fabae* określona z wykorzystaniem techniki odciętych liści. Odmiany oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie dla $\alpha = 0,05$ (analiza wariancji, test NIR Fishera)

Fig. 4. Resistance of fabae bean cultivars to 4 isolates of *A. fabae* evaluated using detached leaves technique. Cultivars marked with the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$ (analysis of variance, Fisher's LSD test)



Rys. 5. Zróznicowanie agresywności izolatów *B. fabae* wobec sześciu odmian bobiku określone z wykorzystaniem techniki odciętych liści. Izolaty oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie dla $\alpha = 0,05$ (analiza wariancji, test NIR Fishera)

Fig. 5. Pathogenicity of isolates of *B. fabae* towards six faba bean cultivars evaluated using detached leaves technique. Isolates marked with the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$ (analysis of variance, Fisher's LSD test)



Rys. 6. Odporność odmian bobiku na porażenie 2 izolatami *B. fabae* określona z wykorzystaniem techniki odciętych liści. Odmiany oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie dla $\alpha = 0,05$ (analiza wariancji, test NIRA Fishera)

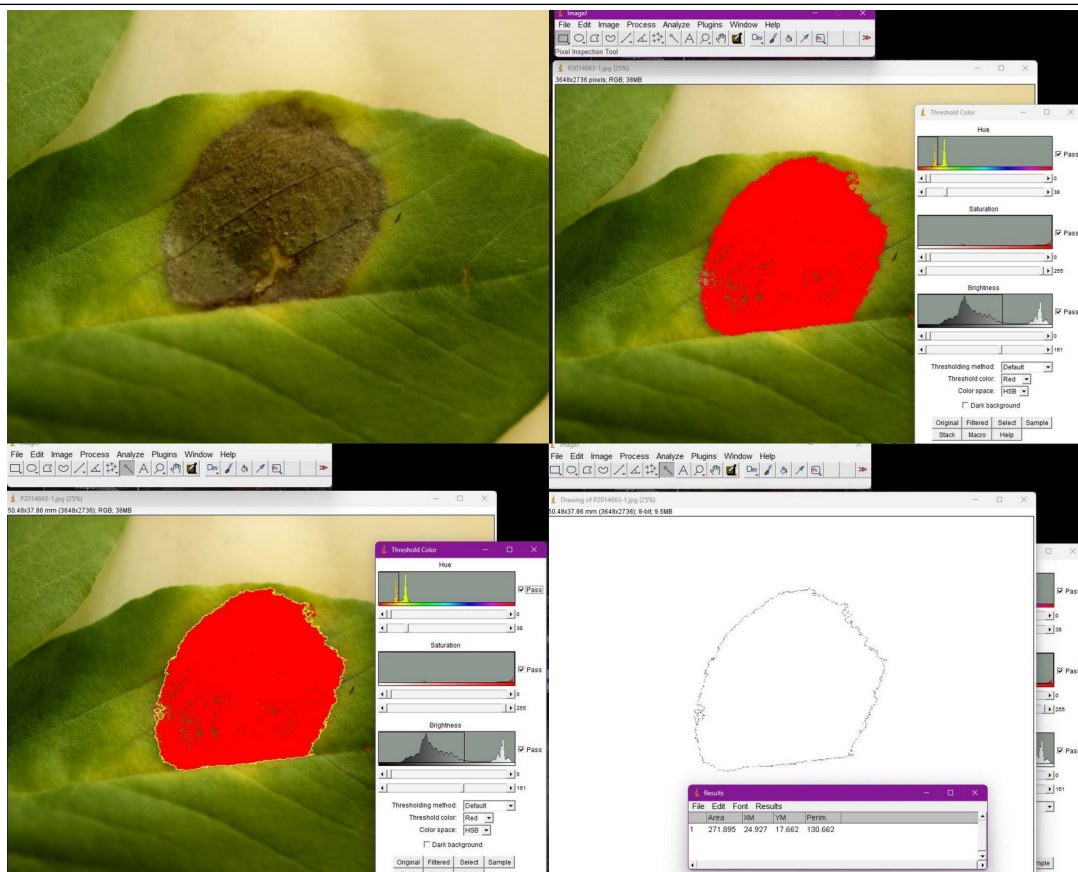
Fig. 6. Resistance of fabae bean cultivars to 2 isolates of *B. fabae* evaluated using detached leaves technique. Cultivars marked with the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$ (analysis of variance, Fisher's LSD test)

Najwyższą odporność wykazały odmiany Optimal (SK) i Kasztelan, najniższą – odmiany Amulet i Albus. Zróznicowanie odporności odmian na czekoladową plamistość było jednakże niższe niż obserwowane dla askochytozy (Tab. 2). Potwierdzają to również kilkuletnie obserwacje występowania czekoladowej plamistości w warunkach polowych w Radzikowie (Boros i in. 2014; T. Góral niepublikowane). W latach o dużym nasileniu czekoladowej plamistości większość odmian porażana była w podobnym stopniu. Wyróżniały się jedynie odmiany samokończące, na których nasilenie choroby (oceniane jako stopień porażenia liści na całej roślinie) było wyższe. Wyniki publikowanych badań również pokazują, że istnieje małe zróżnicowanie odporności genotypów bobiku na czekoladową plamistość (Sillero i in., 2010). Problemem w hodowli odpornościowej jest brak dobrych źródeł odporności bobiku na tę chorobę. Większość zidentyfikowanych genotypów odpornych pochodzi z andyjskich regionów Ameryki Południowej i nie jest dostosowana na warunków europejskich (Bond i in., 1994; Maalouf i in., 2016).

Na rysunku 7 przedstawiono kolejne etapy pomiaru powierzchni plamy nekrotycznej opisane w rozdziale Materiał i Metody. Opisany proces pomiaru stanowi jedynie przykład wykorzystania programu ImageJ. Można go modyfikować wykorzystując rozbudowane opcje oprogramowania, dostosowując je do własnych potrzeb (Abd-El-Haliem, 2012; Mutka i in., 2015). Stewart i in. (2016) opracowali makro do programu ImageJ do oceny nasilenia septoriozy paskowanej (sprawca *Zymoseptoria tritici*) na liściach pszenicy. Dla każdego liścia makro umożliwiało pomiar całkowitej powierzchni liścia, całkowitej powierzchni nekrozy, liczby piknidiów, średnią wielkość pikni-

dium oraz tzw. odcień szarości piknidium. Ta ostatnia cecha oznacza intensywność produkcji melaniny przez izolaty *Z. tritici*, który to związek pełni istotną rolę dla wirulencji patogenu (Lendenmann i in., 2014). Elliott i in. (2022) porównywali metody analizy obrazu za pomocą ImageJ oraz uczenia maszynowego do oceny porażenia manioku przez bakterię *Xanthomonas*. Autorzy stwierdzili, że obie metody precyzyjnie rozróżniały i określały ilościowo różne typy zmian powodowanych przez *Xanthomonas* na liściach manioku. Metoda ImageJ była bardziej przydatna do analizy mniejszych zestawów danych, ponieważ wymagała tworzenia przez użytkownika maski dla każdego obrazu.

Uzyskanie precyzyjnych pomiarów wymaga ujednolicenia wykonywanych zdjęć liści z objawami chorobowymi. Metodyka opisana jest na przykład w pracy Bartosiaka (2020), dotyczącej oceny porażenia liści siewek pszenicy inokulowanej grzybem *Parastagonospora nodorum*. W swojej pracy Bartosiak (2020) proponuje również automatyzację oceny objawów chorobowych za pomocą aplikacji w języku Python. Jest to aplikacja stworzona specjalnie do celów oceny porażenia liści i przyspiesza oraz ułatwia pracę w porównaniu do dość skomplikowanego programu ImageJ. Podobnie Alheeti i in. (2021) wskazali, że użycie ImageJ do oceny porażenia liści przez dwa patogeny grzybowe jest bardziej pracochłonne niż porównywanej przez autorów aplikacji Leaf Doctor (darmowa aplikacja na iPhone'a) (Pethybridge i Nelson, 2015). Rozwiązaniem tego problemu może być opracowywanie wtyczek (plug-in) do programu ImageJ. Przykładem jest wtyczka HTPheno opracowana w Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) (<http://htpheno.ipk-gatersleben.de/>) (Hartmann i in.,



Rys. 7. Pomiar powierzchni plamy nekrotycznej przy użyciu programu ImageJ. A. Nekroza na liściu bobiku spowodowana przez grzyb *A. fabae*; B. Wyróżnianie obszaru plamy; C. Obrys wyróżnionego obszaru; D. Pomiar powierzchni plamy

Fig. 7. Necrotic area measurement using ImageJ software. A. Necrotic lesion on faba bean leaf caused by *A. fabae*; B. Highlighting necrotic lesion; C. Outline of the highlighted area; D. Measuring the area of the lesion.

2011). Wtyczka to może być wykorzystywana do zautomatyzowanej analizy obrazu w wysokowydajnym fenotypowaniu roślin.

Podsumowanie wyników

- 1) Zróżnicowanie patogeniczności izolatów *A. fabae* i *B. fabae* wobec badanych odmian bobiku było istotne statystycznie.
- 2) Odmiany bobiku wykazały istotną statystycznie zróżnicowaną odporność na askochytozę (*A. fabae*) i czekoladową plamistość (*B. fabae*).
- 3) Wyniki analizy wariancji pokazały, że zróżnicowanie odporności odmian na czekoladową plamistość było mniejsze niż odporności na askochytozę.

Literatura

Abd-El-Haliem, A., 2012. An unbiased method for the quantitation of disease phenotypes using a custom-built macro plugin for the program ImageJ. In: Bolton, M., Thomma, B. (eds) Plant Fungal Pathogens. Methods in Molecular Biology, vol 835. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_41

- 4) Wykonane analizy obrazu pokazują przydatność oprogramowania ImageJ do oceny porażenia liści przez grzyby patogeniczne dla bobiku.

Badania zrealizowano w ramach Programu Wieloletniego „Tworzenie Naukowych Podstaw Postępu Biologicznego i Ochrony Roślinnych Zasobów Genowych jako Źródło Innowacji i Wspierania Zrównoważonego Rolnictwa i Bezpieczeństwa Żywnościowego Kraju” finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, realizowanego w IHAR-PIB w latach 2015-2020.

Alheeti, A.A.M., Farhan, M.A., Al-Saad, L.A., Theer, R.M., 2021. Evaluation of the performance of ImageJ, Leaf Doctor applications, and visual assessments in measuring severity of two leaf spot diseases. IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 761. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/761/1/012030>

- Avila, C.M., Satovic, Z., Sillero, J.C., Rubiales, D., Moreno, M.T., Torres, A.M., 2004. Isolate and organ-specific QTLs for ascochyta blight resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Theor. Appl. Genet.* 108, 1071–1078. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1514-7>
- Avila, C.M., Atienza, S.G., Moreno, M.T., Torres, A.M., 2007. Development of a new diagnostic marker for growth habit selection in faba bean (*Vicia faba* L.) breeding. *Theor. Appl. Genet.* 115, 1075–1082. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0633-y>
- Bartosiak, S., 2020. Automatyzacja oceny objawów chorobowych septoriozy zbóż z wykorzystaniem komputerowej analizy obrazu w języku programowania Python. *Biul. Inst. Hod. i Aklim. Roślin* 31–35. <https://doi.org/10.37317/BIUL-2020-0019>
- Blake, S.N., Lee, R.C., Russ, M.H., Farquharson, E.A., Rose, J.A., Herdina, Goonetilleke, S.N., Farfan-Caceres, L.M., Debler, J.W., Syme, R.A., Davidson, J.A., 2022. Phenotypic and Genotypic Diversity of *Ascochyta fabae* Populations in Southern Australia. *Front. Plant Sci.* 13, 2185. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.918211>
- Bond, D.A., Jellis, G.J., Rowland, G.G., Le Guen, J., Robertson, L.D., Khalil, S.A., Li-Juan, L., 1994. Present status and future strategy in breeding faba beans (*Vicia faba* L.) for resistance to biotic and abiotic stresses, w: Muehlbauer, F.J., Kaiser, W.J. (Red.), *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, vol 19. Springer, Dordrecht, Dodrecht, ss. 592–616. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0798-3_36
- Boros L., Góral T., Walentyn-Góral D., Wawer A., Borucka K. 2014. Śledzenie zmian patogeniczności w populacjach ważnych gospodarczo grzybów roślin strączkowych (*Mycosphaerella pinodes*, *Ascochyta fabae*, *Botrytis fabae*, *Fusarium* sp.) – sprawców zgorzelowej plamistości grochu i bobiku. (W:) *Ulepszanie Roślin dla Zrównoważonych AgroEkoSystemów, Wysokiej Jakości Żywności i Produkcji Roślinnej na Cele Nieżywnościowe*. Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR. Red. Edward Arseniuk, Nr 48: 313-322. (całość 408 s.).
- Bouhassan, A., Sadiki, M., Tivoli, B., 2004. Evaluation of a collection of faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes originating from the Maghreb for resistance to chocolate spot (*Botrytis fabae*) by assessment in the field and laboratory. *Euphytica* 135, 55–62. <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000009540.98531.4d>
- Díaz-Ruiz, R., Satovic, Z., Ávila, C.M., Alfaro, C.M., Gutierrez, M. V., Torres, A.M., Román, B., 2009. Confirmation of QTLs controlling *Ascochyta fabae* resistance in different generations of faba bean (*Vicia faba* L.). *Crop Pasture Sci.* 60, 353–361. <https://doi.org/10.1071/CP08190>
- Elliott, K., Berry, J.C., Kim, H., Bart, R.S., 2022. A comparison of ImageJ and machine learning based image analysis methods to measure cassava bacterial blight disease severity. *Plant Methods* 18, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00906-x>
- Fouad, M., Mohammed, N., Aladdin, H., Ahmed, A., Xuxiao, Z., Shiyang, B., Tao, Y., 2013. Faba Bean, w: Singh, M., Upadhyaya, H.D., Bisht, I.S. (Red.), *Genetic and Genomic Resources of Grain Legume Improvement*. Elsevier, London, ss. 113–136. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397935-3.00005-0>
- Gela, T.S., Bruce, M., Chang, W., Stoddard, F.L., Schulman, A.H., Vandenberg, A., Khaza'i, H., 2022. Genomic regions associated with chocolate spot (*Botrytis fabae* Sard.) resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Mol. Breed.* 42, 1–10. <https://doi.org/10.1007/S11032-022-01307-7/FIGURES/3>
- Góral T, Walentyn-Góral D. 2012. Using detached leaf technique for assessment of pathogenicity of *Ascochyta fabae* Speg. isolates to faba bean (*Vicia faba* L.). *Proceedings Book of the IIIrd International Ascochyta Workshop*, 22–26 April. Cordoba, Spain, p. 84.
- Grela, E.R., Czech, A., 2019. Pasze alternatywne w odniesieniu do soi genetycznie modyfikowanej w żywieniu zwierząt. *Wiadomości Zootech.* 2, 66–77.
- Hanounik, S.B., Robertson, L.D., 1989. Resistance in *Vicia faba* germ plasm to blight caused by *Ascochyta fabae*. *Plant Dis.* 73, 202. <https://doi.org/10.1094/PD-73-0202>
- Hartmann, A., Czauderna, T., Hoffmann, R., Stein, N., Schreiber, F., 2011. HTPPheno: An image analysis pipeline for high-throughput plant phenotyping. *BMC Bioinformatics* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-148>
- Herath, I.H.M.H.B., Stoddard, F.L., Marshall, D.R., 2001. Evaluating faba beans for rust resistance using detached leaves. *Euphytica* 117, 47–57. <https://doi.org/10.1023/A:1004071916288>
- Jellis, G.J., Lockwood, G., Aubury, R.G., 1985. Phenotypic influences on the incidence of infection by *Ascochyta fabae* in spring varieties of faba beans (*Vicia faba*). *Plant Pathol.* 34, 347–352. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1985.tb01371.x>
- Kaiser, W.J., Wang, B.C., Rogers, J.D., 2007. *Ascochyta fabae* and *A. lentis*: Host Specificity, Teleomorphs (*Didymella*), Hybrid Analysis, and Taxonomic Status. *Plant Dis.* 81, 809–816. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.7.809>
- Kaur, S., Kimber, R.B.E., Cogan, N.O.I., Materne, M., Forster, J.W., Paull, J.G., 2014. SNP discovery and high-density genetic mapping in faba bean (*Vicia faba* L.) permits identification of QTLs for ascochyta blight resistance. *Plant Sci.* 217–218, 47–55. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2013.11.014>
- Kharrat, M., Le Guen, J., Tivoli, B., 2006. Genetics of resistance to 3 isolates of *Ascochyta fabae* on Faba bean (*Vicia faba* L.) in controlled conditions. *Euphytica* 151, 49–61. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9127-2>
- Kohpina, S., Knight, R., Stoddard, F.L., 2000a. Genetics of resistance to ascochyta blight in two populations of faba bean. *Euphytica* 112, 101–107. <https://doi.org/10.1023/A:1003853126862>
- Kohpina, S., Knight, R., Stoddard, F.L., 2000b. Evaluating faba beans for resistance to ascochyta blight using detached organs. *Aust. J. Exp. Agric.* 40, 707–713. <https://doi.org/10.1071/EA99168>
- Lendenmann, M.H., Croll, D., Stewart, E.L., McDonald, B.A., 2014. Quantitative trait locus mapping of melanization in the plant pathogenic fungus *Zymoseptoria tritici*. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 4, 2519–2533. <https://doi.org/10.1534/g3.114.015289>
- Maalouf, F., Ahmed, S., Shaaban, K., Bassam, B., Nawar, F., Singh, M., Amri, A., 2016. New faba bean germplasm with multiple resistances to Ascochyta blight, chocolate spot and rust diseases. *Euphytica* 211, 157–167. <https://doi.org/10.1007/S10681-016-1726-Y/TABLES/6>
- Mutka, A.M., Bart, R.S., Avni, A., Tör, M., Danforth, D., 2015. Image-based phenotyping of plant disease symptoms. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00734>
- Ondřej, M., Huňady, I., 2007. Faba bean (*Vicia faba* L.) breeding for resistance to anthracnose (*Ascochyta fabae* Speg.) in the Czech Republic. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 43, 61–68.
- Ozkilinc, H., Thomas, K., Abang, M., Peever, T.L., 2015. Population structure and reproductive mode of *Didymella fabae* in Syria. *Plant Pathol.* 64, 1110–1119. <https://doi.org/10.1111/ppa.12359>

- Panek J. 2022. Co uprawia się w Polsce? Struktura zasiewów 2022. <https://terazpole.pl/wokol-pola/co-uprawia-sie-w-polsce-struktura-zasiewow-2022/>
- Pethybridge, S.J., Nelson, S.C., 2015. Leaf doctor: A new portable application for quantifying plant disease severity. *Plant Dis.* 99, 1310–1316. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0319-RE>
- Pritchard, P.R., Rowe, P.S., Rossall, S., 1989. A comparison of infection of resistant and susceptible lines of field bean (*Vicia faba*) by *Ascochyta fabae*. *Plant Pathol.* 38, 266–270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1989.tb02142.x>
- Román, B., Satovic, Z., Avila, C.M., Rubiales, D., Moreno, M.T., Torres, A.M., 2003. Locating genes associated with *Ascochyta fabae* resistance in *Vicia faba*. *Aust. J. Agric. Res.* 54, 85–90. <https://doi.org/10.1071/AR02034>
- Rubiales, D., Trapero-Casas, A., 2002. Occurrence of *Didymella fabae*, the Teleomorph of *Ascochyta fabae*, on Faba Bean Straw in Spain. *J. Phytopathol.* 150, 1–3.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sillero, J.C., Villegas-Fernández, A.M., Thomas, J., Rojas-Molina, M.M., Emeran, A. A., Fernández-Aparicio, M., Rubiales, D., 2010. Faba bean breeding for disease resistance. *F. Crop. Res.* 115, 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.09.012>
- Stewart, E.L., Hagerty, C.H., Mikaberidze, A., Mundt, C.C., Zhong, Z., McDonald, B.A., 2016. An improved method for measuring quantitative resistance to the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using high-throughput automated image analysis. *Phytopathology* 106, 782–788. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-16-0018-R>
- Tivoli, B., Baranger, A., Avila, C.M., Banniza, S., Barbetti, M., Chen, W., Davidson, J., Lindeck, K., Kharrat, M., Rubiales, D., Sadiki, M., Sillero, J.C., Sweetingham, M., Muehlbauer, F.J., 2006. Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica* 147, 223–253. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-3131-4>
- Villegas-Fernández, A. M., Sillero, J.C., Rubiales, D., 2011. Screening faba bean for chocolate spot resistance: evaluation methods and effects of age of host tissue and temperature. *Eur. J. Plant Pathol.* 132, 443–453. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9889-9>
- Walentyn-Góral D., Góral T. 2011. Ocena patogeniczności izolatów *Ascochyta fabae* Speg. wobec bobiku (*Vicia faba* L.) metodą odciętych liści [Evaluation of pathogenicity of *Ascochyta fabae* Speg. isolates to faba bean (*Vicia faba* L.) using detached-leaf technique]. Materiały Sympozjum Naukowego "Fitopatologia: zdrowe rośliny – zdrowi ludzie", Bydgoszcz, 20-22 września 2011, str. 416-417.
- Zaki, K.I., 2010. Evaluation of Some Faba Bean Genotypes for Resistance to chocolate spot. *Egypt. J. Phytopathology* 38, 25–43.
- Zakrzewska, E., 2004. Reaction of morphological types of faba bean to infection with *Ascochyta fabae* Speg. and *Botrytis fabae* Sard. *Plant Breed. Seed Sci.* 49, 3–17.
- Zakrzewska, E., 1988. Variability in the resistance of *Vicia faba* L. to *Ascochyta fabae* Speg. *Hod. Roślin, Aklim. i Nasienn.* 32, 311–317.